

## Concanavalin A-induced hepatitis における CD1 抗原と肝 NKT 細胞の変化

清水 匡一 松浦 晃洋

札幌医科大学医学部病理学第1講座 (主任 菊地浩吉 教授)

Role of CD1 antigen and NKT cells in Concanavalin A-induced hepatitis

Tadakazu SHIMIZU and Akihiro MATSUURA

Department of Pathology (Section I), School of Medicine, Sapporo Medical University

(Chief: Prof. K. KIKUCHI)

**ABSTRACT** The MHC class Ib molecule, CD1, has been conserved throughout mammalian evolution. To assess the function of CD1, we investigated the Concanavalin A-induced hepatitis model that shows increased CD1 expression in hepatocytes. In this hepatitis model, NKT cells were found to be numerically expanded. Cytotoxicity of hepatic mononuclear cells (MNC) was activated by CD1 expression in the target cells and was strongly inhibited by CD1 transfectant used as cold targets. Furthermore, the hepatic MNC depleted of NKT cells demonstrated lower cytotoxic activity against CD1-expressing cells. These observations suggest the possibility that NKT cells recognize CD1 and have cytotoxic activity against CD1 expressing cells. In previous reports about the mouse hepatitis model, chemical factors such as IL-4 and TNF- $\alpha$  production from NKT cells were thought to be very important. Our study provides new insights into the mechanism through which direct interaction of CD1 and NKT cells takes place. (Received December 17, 1997 and accepted December 25, 1997)

**Key words:** CD1, NKT cell, Concanavalin A

### 1 緒 言

CD1 抗原は  $\beta$  2-microglobulin を結合した分子量約 4 万 5 千の膜蛋白である。CD1 分子は MHC クラス I 分子と異なり多型性に乏しいが、遺伝子構築に関しては MHC クラス I 分子との類似性がみられる。以上のことから CD1 分子はクラス Ib に属するとされる<sup>1-3)</sup>。

CD1 の機能は長い間不明であったが、最近、マウス NKT 細胞によって認識されること<sup>4)</sup>や結核菌などマイコバクテリア属の膜脂質抗原を T 細胞に提示すること<sup>5-8)</sup>などが明らかにされ、クラス I、クラス II 分子とは異なる新しい抗原提示分子として注目を集めている。

一方、NKT 細胞は NK 1.1 抗原とともに T 細胞レセプター (TCR) を発現する特殊な T 細胞であり、極めて数が少ないが多量の IL-4 や IFN- $\gamma$  を産生し、それらのサイトカインにより免疫応答を制御していると考えられる<sup>9)</sup>。また最近になって、この NKT 細胞が肝

臓の T 細胞中に比較的多く存在し、V $\alpha$  14-J $\alpha$  281 という均一な TCR を持つとの報告<sup>10)</sup>がみられている。さらに NKT 細胞が CD1 を認識することがわかってきた。

今回我々は、Concanavalin A (Con A) 誘発肝障害モデル<sup>11-14)</sup>を用いて肝臓の CD1 発現の変化と、それに伴う肝 NKT 細胞の機能について検討した。

### 2 実験方法

#### 2.1 実験動物

8 週齢の雄の F344 ラット及び Wistar ラット (日本チャールスリバー) を使用した。

#### 2.2 使用細胞

##### 2.2.1 培養細胞

AH66 (Donryu ラット由来肝細胞癌株)、YAC1 (マウスリンホーマ細胞)、P815 (マウス mast cell 細胞)、及び T9 (F344 ラット由来神経膠肉腫細胞株) を培養細胞株として使用した。培養液には 5% FCS, 2

mM L-glutamine を含む RPMI-1640 及び MEM を用いた。

### 2・2・2 形質転換細胞

哺乳類細胞発現ベクター-pcDL-SR $\alpha$  296 にラット CD1cDNA (27.1) を組み込んだ組換え体 pSRE-27.1<sup>15)</sup> と pSV2 neo を 20:1 の比率で、T9 にリン酸カルシウム法を用いて遺伝子導入した T9/CD1 を用いた<sup>16)</sup>。

### 2・2・3 リンパ系細胞

肝臓内のリンパ球を用いた。リンパ球の分離には、Ficoll-Conray (比重 1.096) 比重遠心法を用いた。肝臓からのリンパ球分画は、下大静脈を腹腔内で結紮し、門脈と下大静脈で閉鎖短絡路を作成、脱血後 0.1% EDTA 加 PBS を 50 cmH<sub>2</sub>O の高さから滴下、肝臓内を灌流し回収した<sup>17)</sup>。

### 2・2・4 NKT 細胞の除去

肝リンパ球  $1 \times 10^6$  個に対してそれぞれ  $1 \mu\text{g}$  の抗ラット TCR $\alpha\beta$  抗体 (R 73, マウス IgG)<sup>18)</sup>、抗ラット NK 抗体 (3.2.3, マウス IgG)<sup>19)</sup> を加え、BioMag (PerSeptive Biosystems) を用いて  $\alpha\beta$  T 細胞及び NK 細胞を除いた分画をそれぞれ得た。NKT 細胞はいずれの抗体でも除かれるため、それぞれの分画の Mixture を FACScan (Becton Dickinson 社) にて解析した後、細胞数を調整して effector として細胞傷害試験に用いた。

### 2・2・5 実質臓器細胞

肝細胞は、脱血後肝臓内を 37°C で加熱した 0.1% コラゲナーゼ (Sigma) および 50 mM EDTA を加えた PBS で灌流し、細胞間質の消化を確認、被膜に割を入れ肝細胞を分散させた。

## 2.3 肝炎モデル

ラット尾静脈より Con A (Sigma) 3 mg を 1 回投与し、投与 24 時間後をもって肝炎モデルとした。肝組織はホルマリン固定の後 HE 標本を作成した。肝臓内リンパ球及び肝細胞については前述の方法で採取した。

### 2・4 抗 CD1 抗体と蛍光抗体法

既報のごとく、ラット CD1 組換え蛋白をウサギに免疫しポリクローナル抗体を作成、protein A sepharose カラム (Pharmacia) を用いて IgG 分画を精製した<sup>16)</sup>。細胞表面抗原の解析には FACScan を用いた。肝細胞及び AH66  $1 \times 10^6$  個に対して一次抗体として  $2.8 \mu\text{g}$  の抗 CD1 抗体を、二次抗体として FITC 標識ヤギ抗ウサギ抗体 (KPL) を用いた。肝リンパ球には  $1 \times 10^6$  個に対して一次抗体としてそれぞれ  $1 \mu\text{g}$  の FITC 標識抗ラット TCR  $\alpha\beta$  抗体、ビオチン標識抗ラット NK 抗体

を、二次抗体としてストレプトアビジン PE (Sigma) を用いた。

### 2・5 細胞傷害試験

細胞傷害試験は、<sup>51</sup>Cr release assay で行った。 $1 \times 10^6$  個の肝細胞、肝癌細胞などに対し 200  $\mu\text{l}$  の RPMI 及び、100  $\mu\text{Ci}$  の <sup>51</sup>Cr sodium chromate を加え、37°C、2 時間インキュベーションし細胞の標識を行った後、RPMI で 2 回洗浄し標的細胞 (target cell) とした。effector には F344 ラットより採取した肝臓 T 細胞を用いた。両者を種々の E/T 比になるように混合、最終容量 200  $\mu\text{l}$  とし、U 底 96 well plate (Corning) で培養を行った。8 時間後、上清 100  $\mu\text{l}$  を回収しシンチレーションカウンターで <sup>51</sup>Cr 活性を測定した。maximum release には最終濃度 1% になるように NonidetP 40 を、spontaneous release には RPMI のみをそれぞれ target cell に加えた。

%specific lysis 及び %inhibition は以下の式で求めた。

%specific lysis = (experimental release - spontaneous release)  $\times$  100 / (maximum release - spontaneous release)

%inhibition = (%specific lysis without cold target - %specific lysis with cold target)  $\times$  100 / %specific lysis without cold target

## 3 成績

### 3・1 Con A 投与によるラット肝組織像の変化

Con A 投与後の肝臓 HE 像を示す (Fig. 1)。投与後 24 時間の肝臓では肝細胞の空胞状の変化や一部グリソン鞘にリンパ球の浸潤を認める。また投与後 48 時間でもほぼ同様の所見を呈していたが、投与後一週間ではこれらの変化は回復しつつあった。

### 3・2 肝細胞表面 CD1 発現の変化

投与後に肝細胞表面の CD1 発現を FACScan で解析した (Fig. 2)。正常のラット肝においても CD1 の発現を認めるが、Con A 投与により用量依存性の CD1 発現の増加が観察された。

### 3・3 肝臓 NKT 細胞の変化

高圧灌流法により得られた肝臓内単核細胞分画 (hepatic MNC) について二重染色による表面マーカーの解析を行った (Fig. 3)。正常のラット hepatic MNC では TCR  $\alpha\beta$  と NKR-P1 のいずれも発現する NKT 細胞が 20% 程度存在していた。肝炎ラットではこの NKT 細胞の割合が 40% 程度に増加していた。

### 3・4 肝リンパ球の細胞傷害活性の増強

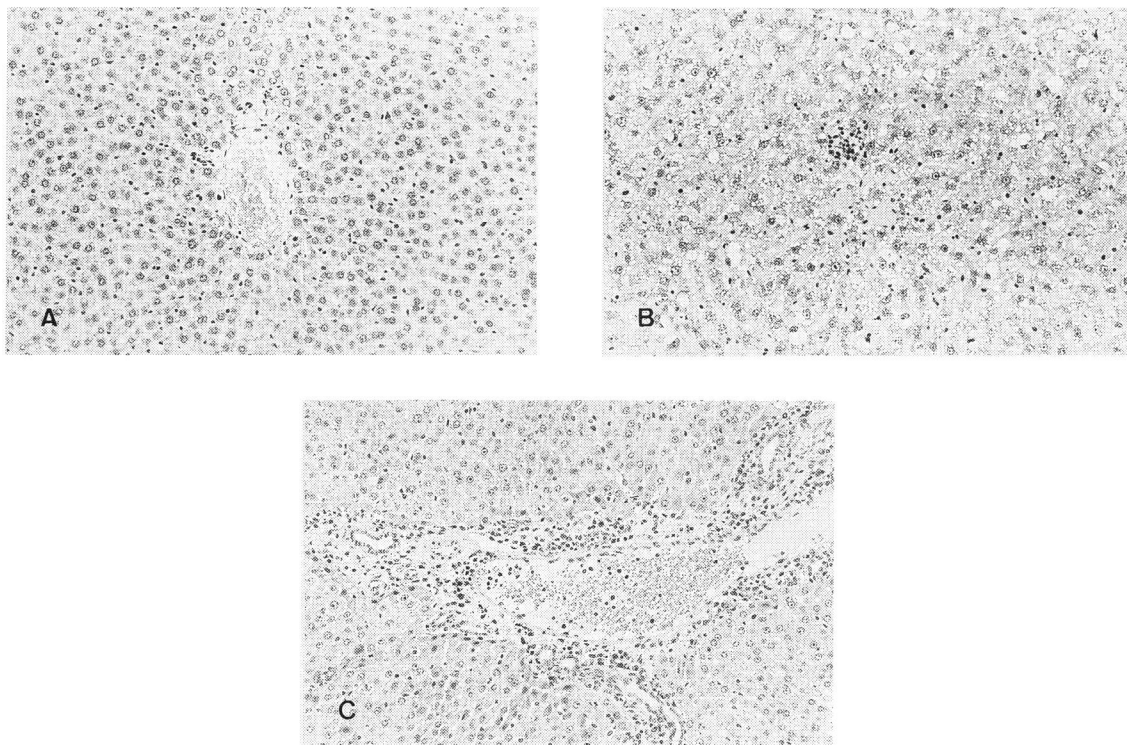


Fig. 1 Effect of Con A treatment on F344 rat liver. The HE staining of liver before (A) and 24hours after (B) (C) Con A treatment.

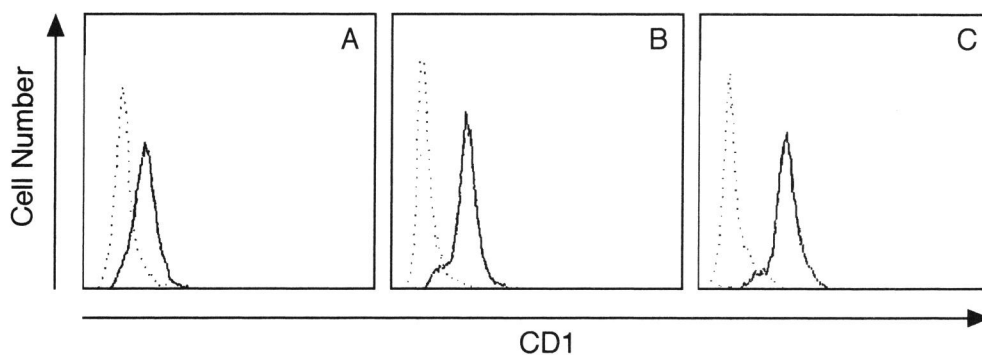


Fig. 2 FACS analysis showing increase of CD1 expression of hepatocytes. CD1 expression of normal (A) and 24hours after 5mg (B), 15mg (C) Con A treatment.

#### 3・4・1 肝細胞及びラット由来肝細胞癌株 AH66 に対する細胞傷害

前述の方法で分離した肝細胞及び AH66 に対する細胞傷害試験ではいずれも肝炎ラットの hepatic MNC を effector とするときと比較的高い活性を示し、また、CD1 を高発現する AH66 (Fig. 4) は肝細胞より強く傷

害を受けた (Fig. 5)。

#### 3・4・2 抑制試験

AH66 に対する細胞傷害試験において NK sensitive である YAC1, LAK sensitive である P815 を用いて抑制試験を行った (Fig. 6)。hepatic MNC はいずれの細胞に対してもほぼ同等の細胞傷害活性を有するが、

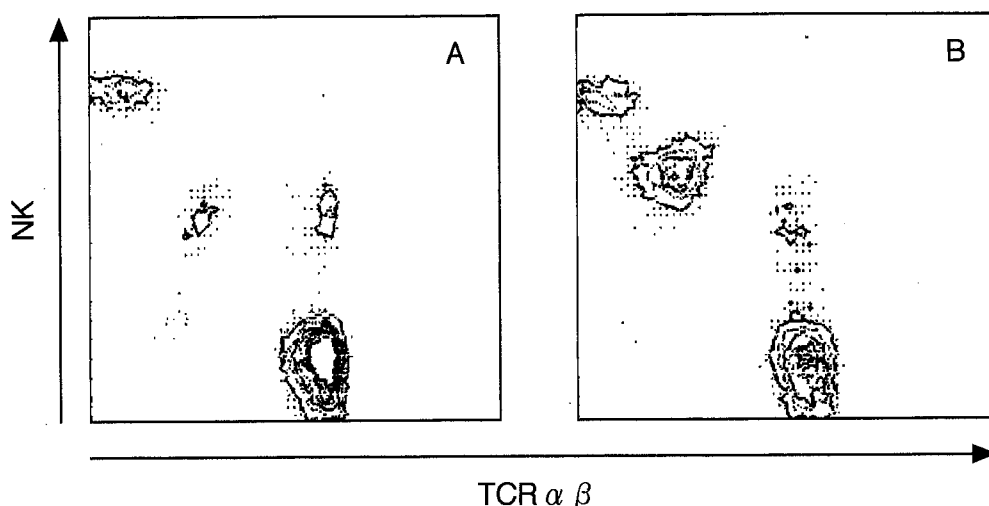


Fig. 3 FACScan analysis of rat hepatic MNCs. Hepatic MNCs were stained with FITC-anti-TCR  $\alpha \beta$ , and PE-anti-NK. (A) Rat hepatic MNCs contain about 20% of NKT cells. (B) 24 hours after Con A treatment NKT cells are about 40% of all.

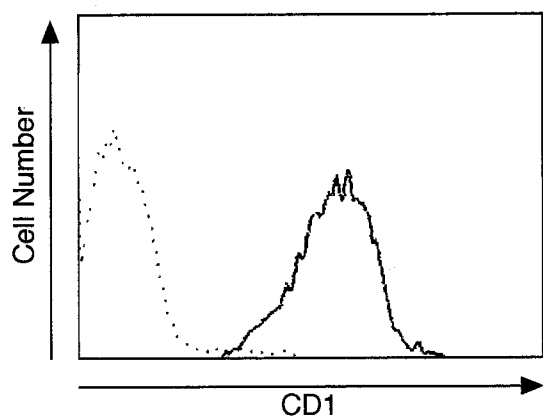


Fig. 4 CD1 expression of AH66 rat hepatoma.

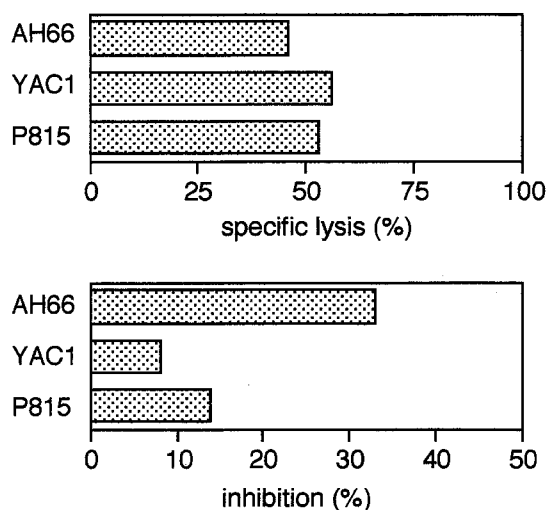


Fig. 6 Cytotoxicity of Con A treated rat hepatic MNC against AH66, YAC1, and P815 (effector: target, 25: 1). Each specific lysis did not differ significantly (upper). Cold target inhibition assay against AH66 with or without AH66, YAC1 and P815 as cold targets (effector: target: cold target, 25: 1: 1) (lower).

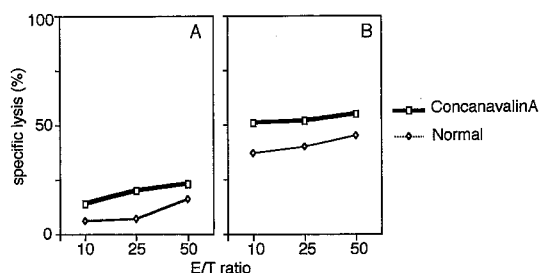


Fig. 5 Cytotoxicity of normal and Con A treated rat hepatic MNC against (A) hepatocyte and (B) AH66.

cold target として用いたときには、AH66 で最も高い抑制効果を示した。また、CD1 transfectant (T9/CD1) を cold target とした試験 (Fig. 7) では、遺伝子導入していない親株の T9 細胞に比べ、CD1 を

発現する細胞で高い抑制効果が観察された。

### 3・4・3 NKT 細胞の影響

前述の方法で NKT 細胞を除去した hepatic MNC を得た (Fig. 8)。この NKT (-) の effector を用いて細胞傷害試験を行った (Fig. 9)。control として YAC1 を用いたが、YAC1 では NKT 細胞の有無にほとんど影響を受けないが、AH66 では NKT (-) の effector で傷害活性が低下している。

## 4 考 察

### 4・1 Con A 肝炎と CD1 発現

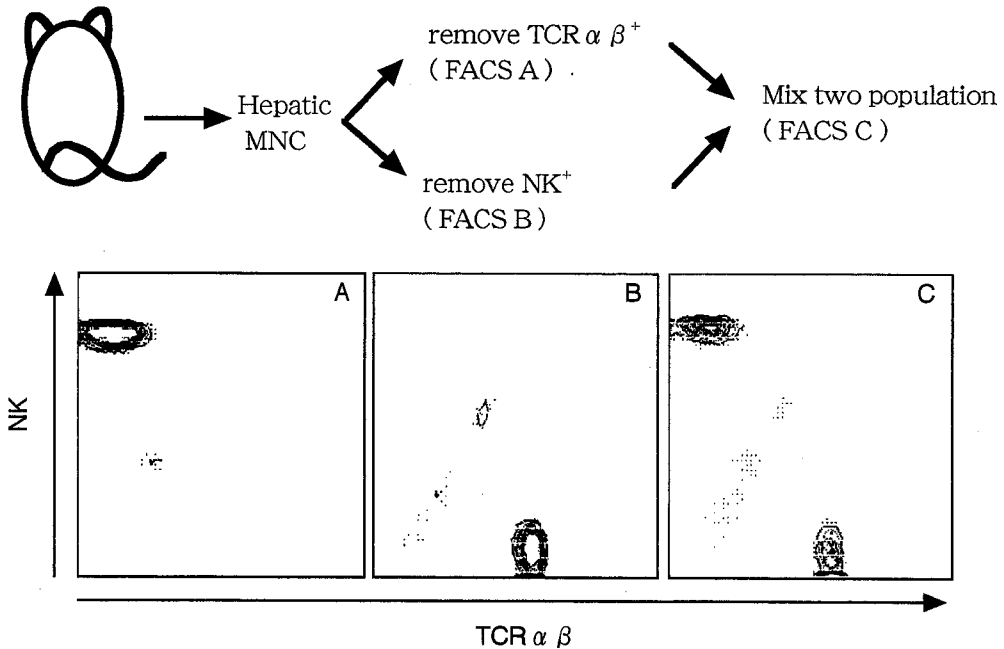


Fig. 8 FACS analysis of cell fraction after depletion of hepatic NK cells (A), TCR  $\alpha\beta^+$  cells (B) or mixture of both fraction (C).

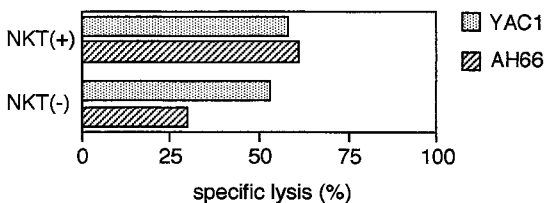


Fig. 9 Cytotoxicity against AH66 and YAC1 by unfractionated hepatic MNC (NKT(+)) and by NKT cell depleted hepatic MNC (NKT(-)). Cytotoxic activity of NKT(-) cells to AH66 was decreased, but to YAC1 was unchanged (effector: target, 25: 1).

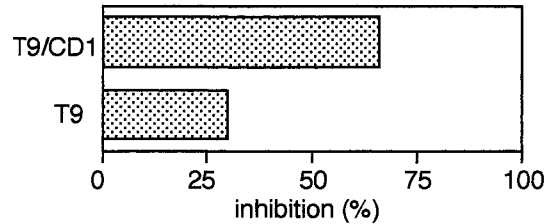


Fig. 7 Cold inhibition assay against AH66 with T9 and T9/CD1 as cold targets (effector: target: cold target, 25: 1: 1).

Con A 肝炎モデルは比較的新しい肝炎モデルとしていくつかの報告がなされている<sup>11-14)</sup>。マウスのモデルでは、投与後 24 時間でグリソン鞘のリンパ球の浸潤、肝細胞壊死、GOT・GPT の上昇などの変化が観察され、肝リンパ球の関与が強く示唆されている。今回の実験では肝細胞壊死はあまり強くないが、グリソン鞘のリンパ球の浸潤を認め、肝リンパ球の関与が予想された。一方でこの肝リンパ球の認識する抗原については不明であるが、今回、Con A 投与により肝細胞表面の CD1 の発現が増加している点に注目し、肝リンパ球と CD1 の関係について検討した。

### 4・2 肝リンパ球と NKT 細胞

肝リンパ球は胸腺外分化をするものを含んでおり、末梢血における profile と相違がみられる。すなわち、いわゆる NKT 細胞とよばれる特殊な T 細胞を多く含んでいる<sup>20)</sup>。今回我々は二重染色法によりラット肝臓にも NK レセプター (NKR-P1A) と TCR の両者を発現する NKT 細胞が存在することを明らかにした。マウス NKT 細胞は TCR  $\alpha\beta$  に加え NK レセプター (NK1.1 抗原, NKR-P1C) を併せ持ち多量の IL-4 を産生するという特徴を持つと報告されている<sup>9)</sup>。この TCR は V $\alpha$ 14-J $\alpha$ 281 という N diversity のない均一な TCR $\alpha$  鎖で谷口らがサプレッサー細胞の TCR として同定したものと同一の遺伝子にコードされている<sup>21)</sup>。肝炎ラットでは NKT 細胞が増加し細胞傷害活性が増強するという結果より、肝炎ラットの肝リンパ球は正常の状態に比べ活性化されており、この活性化に NKT 細胞が関係していること、また CD1 を発現する標的細胞により強い活性を及ぼすことが示唆された。

次に、抑制試験の結果より、AH66 に対する肝リンパ球の細胞傷害活性には NK 及び LAK の関与は否定的であり、また、CD1 transfectant の抑制試験により CD1 が標的分子のひとつである可能性が示された。

effector 側の要因を検討するために、肝リンパ球から NKT 細胞を除去し細胞傷害試験で活性を検討したが、NK 感受性の YAC1 に対する傷害活性は変化が認められないが、CD1 を高発現する AH66 に有意に傷害活性の低下を認め、NKT 細胞がこの傷害活性に大きく関わっていることが明らかになった。

#### 4.3 NKT 細胞による肝細胞への傷害

NKT 細胞の機能に関して最近いくつかの報告がなされた。クラス I 欠損マウスでは NKT 細胞がみられず、IL-4 の産生がおこらない<sup>22)</sup>。このマウスでは Con A 単独では肝炎はおこらないが、IL-4 を同時に投与すると肝炎が発症する<sup>11)</sup>。すなわち、NKT 細胞による IL-4 産生が肝炎の引きがねとなっていると考えられ、続いて CD4<sup>+</sup>T 細胞より TNF $\alpha$  の産生がおこり肝細胞が傷害される。さらに CD1 欠損マウスにおいては V $\alpha$ 14 NKT 細胞が激減し、反応初期の IL-4 産生がおこらないことから、この初期の IL-4 産生がほぼ完全に CD1 に依存することが明らかになった<sup>23)</sup>。また V $\alpha$ 14 NKT 細胞は IL-12 を介する腫瘍の拒絶に不可欠であるとする報告<sup>24)</sup> もなされており、CD1 抗原はリンパ系組織と肝、腸上皮を含めた実質臓器に広く発現している<sup>25)</sup> ことから、肝炎に限らず、より幅広い細胞傷害に深く関わっていることが予想される。NKT 細胞のリガンドは長い間不明であったが、胸腺細胞に発現する CD1 により分

化、発達することが明らかになった<sup>4)</sup>。

#### 4.4 マウスのモデルとの比較

今回の我々の結果では、ラット Con A 肝炎モデルにおいて CD1 発現と NKT 細胞がいずれも増加し肝炎の発症に関わっている。さらにマウスの Con A 肝炎モデルにおいては液性因子が発症に大きく関与しているという報告とは異なり、NKT 細胞が CD1 を認識し CD1 を発現する細胞に対し直接的に細胞傷害活性を持つという新たな機構の存在が示唆された。

#### 4.5 CD1 構造の示唆するもの

CD1 に関してはごく最近になって結晶構造も明らかにされ<sup>26)</sup>、脂質を提示するという報告もあり、新たな抗原提示分子としてその機能や疾患との関わりが注目される。肝障害時に CD1 に結合するリガンドが必要であるかどうかについては今後の検討課題である。

### 5 結 語

Con A 肝炎モデルを用いて CD1 と NKT 細胞の変化について検討した。

- 1) 肝炎ラットでは肝細胞表面の CD1 発現が増加していた。
- 2) 肝炎ラットでは肝リンパ球の NKT 細胞の割合が増加していた。
- 3) NKT 細胞が CD1 を認識し、細胞傷害活性を示すことが示唆された。

#### 謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲をいただいた本学病理学第1講座 菊地浩吉教授ならびに本学脳神経外科学講座 端和夫教授に深謝いたします。

#### 参 考 文 献

1. Strominger J. The  $\gamma\delta$  T cell receptor and class Ib MHC-related proteins. *Cell* 1989, 57: 895-898.
2. Stroynowski I. Molecules related to class-I major histocompatibility complex antigens. *Annu Rev Immunol* 1990, 8: 501-530.
3. Blumberg RS, Gerdes D, Chott A. Structure and function of the CD1 family of MHC-like cell surface proteins. *Immunol Rev* 1995, 147: 5-29.
4. Bendelac A, Lantz O, Quimby ME, Yewdell JW, Bennink JR, Brutkiewicz RR. CD1 recognition by mouse NK1<sup>+</sup> T lymphocytes. *Science* 1995, 268: 863-865.
5. Beckman EM, Porcelli SA, Morita CT. Recognition of a lipid antigen by CD1-restricted  $\alpha\beta$ <sup>+</sup> T

- cells. *Nature* 1994, 372: 691-694.
6. Sieling PA, Chatterjee D, Porcelli SA. CD1-restricted T cell recognition of microbial lipoglycan antigens. *Science* 1995, 269: 227-230.
  7. Moody DB, Reinhold BB, Guy MR, Beckman EM, Frederique DE, Furlong ST, Ye S, Reinhold VN, Sieling PA, Modlin RL, Besra GS, Porcelli SA. Structural requirements for glycolipid antigen recognition by CD1b-restricted T cells. *Science* 1997, 278: 283-286.
  8. Kawano T, Junqing C, Koezuka Y, Toura I, Kaneko Y, Motoki K, Ueno H, Nakagawa R, Sato H, Kondo E, Koseki H, Taniguchi M. CD1d-restricted and TCR-mediated activation of V $\alpha$ 14 NKT cells by glycosylceramides. *Science* 1997, 278: 1626-1629.
  9. Vicari AP, Zlotnik A. Mouse NK1.1<sup>+</sup>T cells: a new family of T cells. *Immunol Today* 1996, 17: 71-76.
  10. Makino Y, Kanno T, Ito T. Predominant expression of invariant V $\alpha$ 14<sup>+</sup> TCR  $\alpha$  chain in NK1.1<sup>+</sup>T Cells. *Int Immunol* 1996, 7: 1157-1161.
  11. Toyabe S, Seki S, Iiai T, Takeda K, Shirai K, Watanabe H, Hiraide H, Uchiyama M, Abo T. Requirement of IL-4 and liver NK1<sup>+</sup>T cells for Concanavalin A-induced hepatic injury in mice. *J Immunol* 1997, 159: 1537-1542.
  12. Gantner F, Leist M, Lohse AW, Germann PG, Tiegs G. Concanavalin A-induced T cell-Mediated hepatic injury in mice. *Hepatology* 1995, 21: 190-198.
  13. Mizuhara H, O'Neill E, Seki N, Ogawa T, Kusunoki C, Otsuka K, Satoh S, Niwa M, Senoh H, Fujiwara H. T cell activation-associated hepatic injury. *J Exp Med* 1994, 179: 1529-1537.
  14. Tiegs G, Hentschel J, Wandel A. A T cell-dependent experimental liver injury in mice inducible by Concanavalin A. *J Clin Invest* 1992, 90: 196-203.
  15. Ichimiya S, Kikuchi K, Matsuura A. Structural analysis of the rat homologue of CD1; Evidence for evolutionary conservation of the CD1d class and widespread transcription by rat cells. *J Immunol* 1994, 153: 1112-1123.
  16. Matsuura A, Takayama S, Kinebuchi M, Hashimoto Y, Kasai K, Kozutsumi D, Ichimiya S, Honda R, Natori T, Kikuchi K. RT1.P, rat class Ib genes related to mouse TL. *Immunogenetics* 1997, 46: 293-306.
  17. Vanderkerken K, Bouwens L, Wisse E. Characterization of a phenotypically and functionally distinct subset of large granular lymphocytes (pit cells) in rat liver sinusoids. *Hepatology* 1990, 12: 70-75.
  18. Hunig T, Hans-Joachim W, Hartley JK, Lawetsky A, Tiefenthaler G. A monoclonal antibody to a constant determinant of the rat T cell antigen receptor that induces T cell activation. *J Exp Med* 1989, 169: 73-86.
  19. Giorda R, Rudert WA, Vavassori A. NKR-P1 a signal transduction molecule on natural killer cells. *Science* 1991, 249: 1298-1300.
  20. Watanabe H, Miyaji C, Kawachi Y, Iiai T, Ohtsuka K, Iwanaga H, Iwanaga H, Abo T. Relationships between intermediate TCR cells and NK1.1<sup>+</sup>T cells in various organs. *J Immunol* 1995, 155: 2972-2983.
  21. Koseki H, Imai K, Nakayama F, Sado T, Moriwaki K, Taniguchi M. Homogenous junctional sequence of the V14<sup>+</sup> T-cell antigen receptor alpha chain expanded in unprimed mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990, 87: 5248-52.
  22. Yoshimoto T, Bendelac A, Watson C, Hu-Li J, Paul WE. Role of NK1.1<sup>+</sup> T cells in a T<sub>H</sub>2 response and in immunoglobulin E production. *Science* 1995, 270: 1845-1847.
  23. Chen YH, Chiu NM, Mandal M, Wang N, Wang CR. Impaired NK1<sup>+</sup>T cell development and early IL-4 production in CD1-deficient mice. *Immunity* 1997, 6: 459-467.
  24. Junqing C, Shin T, Kawano T, Sato H, Kondo E, Toura I, Kaneko Y, Koseki H, Kanno M, Taniguchi M. Requirement for V $\alpha$ 14 NKT cells in IL-12-mediated rejection of tumors. *Science* 1997, 278: 1623-1626.
  25. Kasai K, Matsuura A, Kikuchi K, Hashimoto Y, Ichimiya S. Localization of rat CD1 transcripts and protein in rat tissues. *Clin Exp Immunol* 1997, 109: 317-322.
  26. Zeng ZH, Castano AR, Segelke EA, Stura EA, Peterson PA, Wilson IA. Crystal structure of mouse CD1: An MHC-like fold with a large hydrophobic binding groove. *Science* 1997, 277: 339-345.

別刷請求先:

(〒060-8556) 札幌市中央区南1条西17丁目

札幌医科大学医学部病理学第1講座 清水匡一